

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局  
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 G01N 33/50, 33/15	A1	(11) 国際公開番号 WO00/11470  (43) 国際公開日 2000年3月2日(02.03.00)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04450</p> <p>(22) 国際出願日 1999年8月19日(19.08.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/233729 1998年8月20日(20.08.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115-8543 東京都北区浮間五丁目5番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 清井 仁(KIYOL, Hitoshi)[JP/JP] 〒463-0037 愛知県名古屋市守山区天子田2-1402 トーカンマンション天子田502 Aichi, (JP) 直江知樹(NAOE, Tomoki)[JP/JP] 〒466-0064 愛知県名古屋市昭和区鶴舞4-4-3 Aichi, (JP) 唐渡雅行(TOWATARI, Masayuki)[JP/JP] 〒446-0036 愛知県安城市小堤町16-21 Aichi, (JP) 北村俊雄(KITAMURA, Toshio)[JP/JP] 〒108-0072 東京都港区白金6-16-20-406 Tokyo, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: METHOD FOR SCREENING CANDIDATE COMPOUNDS FOR DRUG AGAINST TUMOR</p> <p>(54)発明の名称 腫瘍に対する医薬品候補化合物のスクリーニング方法</p> <p>(57) Abstract As the results of studies on the appearance frequency of FLT3/ITD in various hematopoietic tumors, it is found out that a particularly high frequency thereof is observed in acute myeloblastic leukemia. As the results of studies on the function of FLT3/ITD in a blood cell line, it is found out that the tyrosine residue of FLT3/ITD is commonly phosphorylated in this cell line and that blood cells having FLT3/ITD transferred thereinto show IL3-independent proliferation. It is moreover found out that blood cells having FLT3/ITD transferred thereinto are capable of forming tumor and show regulated cell differentiation. It is possible to screen medicinal compounds for tumor on the basis of these functions of FLT3/ITD as indication.</p>		

(57)要約

種々の造血器腫瘍におけるFLT3/ITDの出現頻度につき検討を行い、特に急性骨髄性白血病においてその頻度が高いことを見出した。また、血球系細胞株におけるFLT3/ITDの機能の検討を行い、該細胞株において、FLT3/ITDのチロシン残基が恒常的にリン酸化されていること、および、FLT3/ITDを導入した血球系細胞が、IL3非依存的な増殖を示すことを見出した。更に、FLT3/ITDを導入した血球系細胞は腫瘍形成能を有しており、また、細胞の分化が抑制されることを見出した。本発明者らはFLT3/ITDのこれらの機能の抑制を指標とした、腫瘍に対する医薬品化合物のスクリーニングが可能であることを見出した。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GN	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GM	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア			TR	トルコ
CC	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノールウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明細書

## 腫瘍に対する医薬品候補化合物のスクリーニング方法

技術分野

本発明は、腫瘍、特に造血器腫瘍に対する医薬品候補化合物をスクリーニングする方法に関する。より詳しくは、血球系細胞等の動物細胞におけるFLT3/ITDの機能を抑制する化合物のスクリーニング方法に関する。

背景技術

FLT3は、KIT、FMS、およびPDGFRなどと共に、受容体型チロシンキナーゼ(RTK)のクラスIIIに属するタンパク質で、造血系に関与していると考えられている(O.Rosnetら,1991,Genomics 9:380-385, O.Rosnetら,1991, Oncogene 6:1641-1650, W.Matthewsら,1991,Cell 65:1143-1152, O.Rosnetら,1993,Blood 82:1110-1119)。構造的には、RTKは5個のイムノグロブリン様ドメインからなる細胞外領域と、1つの膜近傍領域(JMドメイン)、キナーゼ挿入ドメイン(KIドメイン)に挟まれた2つのチロシンキナーゼドメイン(TK1およびTK2)、および、C末端ドメインを有する。FLT3は、脳、胎盤、肝臓に加え、造血幹細胞において強く発現している(O.Rosnetら,1991, Oncogene 6:1641-1650, W.Matthewsら,1991,Cell 65:1143-1152, O.Rosnetら,1993,Blood 82:1110-1119, L.S.Rusten,1996,87:1317-1325)。FLT3のリガンド(FL)は骨髄のストローマ細胞から発現され、膜結合型と可溶型が存在し、単独あるいは他のサイトカインと共働して幹細胞を刺激する(C.Hannumら,1994,Nature 368:643-648, H.J.McKennaら,1995,Blood 86:3413-3420, F.Hirayama,1995,Blood 85:1762-1768, M.Lisovskyら,1996,Leukemia 10:1012-1018)。従って、FLとFLT3によるリガンド-受容体の相互作用は、造血系において重要な機能を果たしていると考えられる。

一方、急性骨髄性白血病(AML)や急性リンパ性白血病(ALL)患者の試料では、ほとんどの場合FLT3の高発現が観察され、慢性骨髄性白血病(CML)でもFLT3の高発現が見られる。また、FLの刺激により、ALL細胞よりもAML細胞の増殖が顕著に高まることが知られている(W.Piacibelloら,1995,Blood 86:4105-4114, A.S tacchiniら,1996,Leukemia 10:1584-1591, M.Lisovskyら,1996,Blood 88:3987-3997, F.Birgら,1992,Blood 80:2584-2593, U.Dehmelら,1996,Leukemia 10:261-270)。このことから、FLT3は、骨髄系の細胞に特異的な機能を有している可能性が考えられている。また、幾つかの白血病-リンパ腫細胞株では、FLT3とFLの両方が発現しており(N.DaSilvaら,1994,Leukemia 8:885-888, G.Meierhoff,1995,Leukemia 9:1368-1372)、自己分泌(autocrine)または傍分泌(paracrine)の機構が示唆されている(H.G.Drexler,1996,Leukemia 10:588-599)。

近年、癌におけるサイトカイン受容体の変異が注目されている。今日までに、ヒトの白血病で、c-fmsやc-kitの変異が報告されている(B.LowenbergおよびI.P.Touw,1993,Blood 81:281-292)。変異c-fmsをトランスフェクトしたマウスNIH3T3細胞はリガンド非依存的なトランスフォーメーションを起こす(M.Rousseauら,1988,Cell 55:979-988)が、ほとんどの白血病患者の細胞で、fmsのリガンドであるM-CSFは、増殖を僅かしか上昇させないことから、FMSの変異の重要性はまだよくわかっていない(B.LowenbergおよびI.P.Touw,1993,Blood 81:281-292)。また、KITとそのリガンドであるSCFは白血病細胞や幹細胞を増殖させる(B.LowenbergおよびI.P.Touw,1993,Blood 81:281-292, O.Witte,1990,Cell 63:5-6)。しかしながら、マスト細胞白血病細胞株にはc-kit遺伝子の変異が見つかる(T.Tsujimuraら,1994,Blood 83:2619-2626, H.Kitayama,1996,Blood 88:995-1004, Y.Tsujimuraら,1996,Blood 87:273-283)ものの、臨床試料では未だ十分確認されていない。

最近、AML患者の中に、FLT3の体細胞変異が発見された(M.Nakaoら,1996,Leukemia 10:1911-1918)。これらの変異体は、FLT3遺伝子のJMドメインをコードし

ている領域が直列に重複(ITD; internal tandem duplication)していた。重複配列は、主にエクソン11/12およびイントロン11を含んでおり、その長さは試料によって様々であったが、それらは読み枠がインフレームであり、蛋白に翻訳可能で長いJMドメインを有している点が共通していた。

FLT3変異は、AML患者の約20%、骨髄異形成症候群(MDS)患者の約3%に見られ、慢性骨髄性白血病(CML)やリンパ性造血器腫瘍の患者には見られない(S.Yokotaら,1997,Leukemia 11:1605-1609)。AMLの患者において、ITDを有する変異FLT3遺伝子(以後FLT3/ITDと記す)が、本発明者らの知見によれば、診断時には見られなくて、再発時に見られる例があることから、FLT3/ITDが白血病の進行と関わっていることが示唆される。しかしながら、白血病の進行におけるFLT3/ITDの機能についてはいまだ何ら報告されていない。

#### 発明の開示

本発明は、白血病などの造血器腫瘍におけるFLT3/ITDの機能を解明し、FLT3/ITDの機能の抑制を指標とした、造血器腫瘍等に対する医薬品候補化合物のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

本発明者らは、上記課題を解決すべく、血球系細胞株におけるFLT3/ITDの機能の検討を行い、該細胞株において、FLT3/ITDのチロシン残基が恒常的にリン酸化されていること、および、FLT3/ITDを導入した血球系細胞が、IL3非依存的な増殖を示すこと、更に、同系マウスに接種することにより、腫瘍が形成されることを見出した。これら事実、FLT3/ITDのチロシン残基のリン酸化を介する、FLT3/ITDからの増殖シグナルにより、IL3非依存的な細胞増殖が引き起こされ、これが特に急性骨髄性白血病などの造血器腫瘍の進行に関係していることを示唆した。このため、本発明者らはFLT3/ITDの機能の抑制を指標として造血器腫瘍等に対する医薬品候補化合物のスクリーニングを行うことが可能であることを見出した。

本発明は、特に、血球系細胞におけるFLT3/ITDの機能を抑制を指標とした、造血器腫瘍等に対する医薬品候補化合物のスクリーニング方法に関し、より具体的には、

- (1) 腫瘍に対する医薬品候補化合物をスクリーニングする方法であって、
  - (a) FLT3/ITDの発現によってサイトカイン非依存的増殖を示す動物細胞を提供する工程、
  - (b) 該細胞に対し被検試料を接触させ、サイトカイン非存在下において培養する工程、
  - (c) 該細胞の増殖を検出する工程、および
  - (d) 該細胞の増殖を抑制する化合物を選択する工程、を含む方法、
- (2) 腫瘍に対する医薬品候補化合物をスクリーニングする方法であって、
  - (a) FLT3/ITDの発現によってサイトカイン非依存的増殖を示す動物細胞を提供する工程、
  - (b) 該細胞に対し被検試料を接触させ、サイトカイン非存在下において培養する工程、
  - (c) 該細胞におけるFLT3/ITDのリン酸化を検出する工程、および
  - (d) 該細胞におけるFLT3/ITDのリン酸化を抑制する化合物を選択する工程、を含む方法、
- (3) 腫瘍に対する医薬品候補化合物をスクリーニングする方法であって、
  - (a) FLT3/ITDの発現によってサイトカイン非依存的増殖を示す動物細胞を提供する工程、
  - (b) 該細胞を非ヒト哺乳類動物に接種して腫瘍を形成させる工程、
  - (c) 該細胞を接種する前あるいは接種後に被検試料を該非ヒト哺乳類動物に投与し、腫瘍の形成を検出する工程、および
  - (d) 該非ヒト哺乳類動物の腫瘍の形成を抑制する化合物を選択する工程、

を含む方法、

(4) 腫瘍に対する医薬品候補化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) FLT3/ITDの発現によって分化誘導能が抑制された動物細胞を提供する工程、

(b) 該細胞に対して被検試料を接触させて培養する工程、

(c) 該細胞の分化誘導能を検出する工程、および

(d) 該細胞の分化を促進する化合物を選択する工程、

を含む方法、

(5) 腫瘍が造血器腫瘍である、(1)から(4)のいずれかに記載の方法

(6) 造血器腫瘍が急性骨髄性白血病または骨髄異形成症候群である、(5)に記載の方法、

(7) サイトカインがIL3である、(1)から(3)のいずれかに記載の方法

(8) 動物細胞が血球系細胞である、(1)から(4)のいずれかに記載の方法、

(9) 血球系細胞がFDC-P1細胞、32D細胞またはBaF3細胞である、(8)に記載の方法、

(10) 動物細胞が32D細胞である、(4)に記載の方法、

(11) (1)から(10)のいずれかに記載の方法により単離しうる、腫瘍に対する医薬品候補化合物、に関する。

実施例に示したように、FLT3/ITDを導入した幼若顆粒球系細胞株FDC-P1(ATCC CRL-12103)において、FLT3/ITDのチロシン残基のリン酸化が検出された(実施例3)。また、親細胞のFDC-P1はIL3依存性であるのに対して、FLT3/ITDを導入したFDC-P1はIL3非依存的な増殖を示すことが判明した(実施例4)。これら事実、FLT3の直列重複(ITD)変異が、血球系細胞の腫瘍化に機能的に関わって

いることを初めて明らかにするものである。本発明者らは、上記したFLT3/ITDの機能を阻害することによって、細胞の異常増殖を抑制し、白血病等の造血器腫瘍を含む腫瘍の治療を行うことが可能であることを見出した。

従って、本発明の造血器腫瘍等に対する医薬品候補化合物のスクリーニング方法の一つの態様は、FLT3/ITDを発現させた血球系細胞等の動物細胞の増殖の抑制を指標とする方法である。この方法は、具体的には、(a) FLT3/ITDの発現によってサイトカイン非依存的増殖を示す動物細胞を提供する工程、(b) 該細胞に対し被検試料を接触させ、サイトカイン非存在下において培養する工程、(c) 該細胞の増殖を検出する工程、および(d) 該細胞の増殖を抑制する化合物を選択する工程、を含む。

また、本発明の造血器腫瘍等に対する医薬品候補化合物のスクリーニング方法の他の一つの態様は、血球系細胞等におけるFLT3/ITDのチロシン残基のリン酸化の抑制を指標とする方法である。この方法は、具体的には、(a) FLT3/ITDの発現によってサイトカイン非依存的増殖を示す動物細胞を提供する工程、(b) 該細胞に対し被検試料を接触させ、サイトカイン非存在下において培養する工程、(c) 該細胞におけるFLT3/ITDのリン酸化を検出する工程、および(d) 該細胞におけるFLT3/ITDのリン酸化を抑制する化合物を選択する工程、を含む。

さらに、本発明の造血器腫瘍等に対する医薬品候補化合物のスクリーニング方法の他の一つの態様は、FLT3/ITDを発現させた血球系細胞等の動物細胞による腫瘍の形成の抑制を指標とする方法である。この方法は、具体的には、(a) FLT3/ITDの発現によってサイトカイン非依存的増殖を示す動物細胞を提供する工程、(b) 該細胞を非ヒト哺乳類動物に接種して腫瘍を形成させる工程、(c) 該細胞を接種する前あるいは接種後に被検試料を該非ヒト哺乳類動物に投与し、腫瘍の形成を検出する工程、および(d) 該非ヒト哺乳類動物の腫瘍の形成を抑制する化合物を選択する工程、を含む。

また、本発明の造血器腫瘍等に対する医薬品候補化合物のスクリーニング方法の他の一つの態様は、FLT3/ITDを発現させた血球系細胞等の動物細胞の分化誘導能、即ち該細胞の分化を促進する作用を指標とする方法である。この方法は、具体的には、(a) FLT3/ITDの発現によって分化誘導能が抑制された動物細胞を提供する工程、(b) 該細胞に対して被検試料を接触させて培養する工程、(c) 該細胞の分化誘導能を検出する工程、および(d) 該細胞の分化を促進する化合物を選択する工程、を含む。細胞の分化を促進する化合物としては、単独で該細胞の分化を促進するものであっても、細胞の分化を促進することが知られている既知のサイトカインと協調して促進するものであってもよい。

本発明においてスクリーニングされる医薬品候補化合物の対象とする腫瘍としては、FLT3の直列重複(ITD)変異に起因する腫瘍であれば特に制限はなく、中でも造血器腫瘍、例えば、急性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群が挙げられ、特に、急性骨髄性白血病が対象疾患として好適である。

スクリーニングに用いる被検試料としては、例えば、精製タンパク質(抗体を含む)、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成ペプチドのライブラリー、細胞抽出液、細胞培養上清、合成低分子化合物のライブラリー、オリゴヌクレオチドなどが挙げられるが、これらに制限されない。

スクリーニングに利用する細胞としては、FLT3/ITDの発現によって、サイトカイン非依存的増殖を示す動物細胞または分化誘導能が抑制された動物細胞であれば制限はないが、血球系細胞(造血幹細胞を含む)が好適である。例えば、FLT3/ITDの発現によってIL3非依存的な増殖を示すFDC-P1細胞(ATCC:CRL-12103)、32D細胞(理研細胞バンク:RCB1145)、Ba/F3細胞(理研細胞バンク:RCB0805)、DA-3細胞(理研細胞バンク:RCB1144)等が挙げられる。特に、FDC-P1細胞、32D細胞、Ba/F3細胞が好適である。細胞内でのFLT3/ITDの発現は、当業者に公知の遺伝子操作技術により行うことができる。細胞内で発現させるF

LT3/ITDとしては、サイトカイン非依存的に血球系細胞の増殖を誘導しうるものであればよく、例えば、配列番号：2、4、6または8に記載のアミノ酸配列を有するFLT3/ITDを用いることができる。また、文献(S. Yokotaら, 1997, Leukemia 11: 1605-1609、H. Kiyoiら, 1997, Leukemia 11: 1447-1452)に記載のFLT3/ITD配列を用いることもできる。その他、造血器腫瘍の患者から新たに得られるFLT3/ITDを用いることもできる。また、FLT3/ITDは、人工的に合成したものであっても、細胞由来のものであってもよい。

細胞への被検試料の接触は、被検試料の種類に応じて、被検試料の細胞培養培地への添加や被検試料の細胞内への導入などの方法で行うことができる。

以下①から④に具体的なスクリーニング方法の一例を示すが、本発明の方法はこれに制限されない。

① 正常FLT3またはFLT3/ITDを市販のネオマイシン耐性遺伝子などの選択マーカーを含む発現ベクターに組み込み、Bio-Rad Gene Pulser Cuvettes (バイオラド) 等を用いてFDC-P1細胞や32D細胞等へ導入する。FLT3/ITD導入細胞を選択後、 $5 \times 10^4$ 個程度の細胞を24wellプレート上に播き、被検試料存在下または非存在下で37°C、CO<sub>2</sub>インキュベータ中にて培養し、2～3日後に生細胞数をトリパンブルーまたはMTTアッセイ等により計測し、細胞の増殖を抑制する化合物を選択することができる。

② 正常FLT3またはFLT3/ITDを市販のネオマイシン耐性遺伝子などの選択マーカーを含む発現ベクターに組み込み、Bio-Rad Gene Pulser Cuvettes (バイオラド) 等を用いてFDC-P1細胞や32D細胞等へ導入する。FLT3/ITD導入細胞を選択後、 $1 \times 10^6$ 個程度の細胞を10cmプレート上に播き、[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATPを加え、被検試料存在下または非存在下で37°C、CO<sub>2</sub>インキュベータ中にて培養する。その後、細胞抽出物を調製し、抗FLT3抗体および抗リン酸化チロシン抗体で免疫沈降後、電気泳動を行い、オートラジオグラフィーでFLT3/ITD中の放射性同位元素を検出することで、FLT3のチロシンリン酸化を抑制する化合物を選択すること

ができる。

③ FLT3/ITDを上記①のようにして導入して形質転換したFDC-P1細胞を $2 \times 10^7$ 個程度、FDC-P1細胞が樹立されたマウスDBA2（ストレイン）の皮下に接種したところ、接種後、該マウスは約2週間で腫瘍を形成した。形成された腫瘍にFLT3/ITDのDNAおよび蛋白質がそれぞれ発現していることを確認した（図3A及びB）。その際、特に放射線照射などの処理を施さなくとも腫瘍が形成された。すなわち、FLT3/ITDで形質転換した血球系細胞等を、該細胞と同系のマウスなどの非ヒト哺乳類動物に接種するとFLT3/ITDによる腫瘍が形成される。したがって、この非ヒト哺乳類動物に、形質転換した血球系細胞等を接種する前、あるいは、接種後に被検試料を経皮、経静脈または経口的に投与し、腫瘍の形成あるいは消長を調べることによって腫瘍の増殖を抑制する化合物を選択することができる。

④ また、本発明者らは、例えば32D細胞は、IL3依存性細胞でありG-CSFの存在下で分化が誘導されるが、FLT3/ITDを導入するとG-CSFによる上記分化誘導が抑制されることを見出している。したがって、正常FLT3またはFLT3/ITDを上記①のようにして導入して形質転換した血球系細胞等を $5 \times 10^4$ 個程度24wellプレートにまき、被検試料を添加して経時的にサイトスピン標本を作成し、メイギムザ染色、ペルオキシダーゼ染色、エステラーゼ染色またはアルカリフォスファターゼ染色などにより、分化誘導能を調べるか、あるいは、フローサイトメトリーにてCD11b、CD13、CD14、CD33などの発現を調べることにより分化誘導能を調べることにより、分化誘導能を促進する化合物を選択することができる。

なお、細胞増殖を指標としたスクリーニング系においては、非選択的細胞毒性物質の影響を除外するため、親細胞をIL3存在下で培養し、被検化合物を加え、IL3依存性増殖に対する被検化合物の影響を同時に調べるのが好ましい。

本発明におけるスクリーニングにより単離される化合物としては、種々の作用点を有するものが考えられる。例えば、FLT3/ITDに直接作用してその機能を

阻害するもの、FLT3/ITDまたはリン酸化FLT3/ITDに結合する分子（例えば、SHC、Grb2、Cb1、PI3K、RAS-GAP、PLC- $\gamma$ などのアダプタータンパク質など）に作用して間接的にFLT3/ITDの機能を阻害するもの、FLT3/ITDから細胞増殖に至るまでのシグナル伝達に関与するタンパク質群に作用するもの、FLT3/ITDのリン酸化を行うタンパク質に作用してその機能を阻害するもの、FLT3/ITDからそのリン酸化に至るまでのシグナル伝達に関与するタンパク質群に作用するもの、恒常的にリン酸化しているFLT3/ITDを脱リン酸化するものが含まれる。

これら化合物は、FLT3/ITDの発現が関与する上記造血器腫瘍等の治療薬の候補になる。スクリーニングされる化合物の中で、FLT3/ITDの機能を特異的に阻害し、正常FLT3の機能は阻害しない化合物は、FLT3/ITDに起因する上記疾患の特異的な治療薬となるため好ましい。

本発明のスクリーニング法により単離される化合物を、医薬品として用いる場合には、公知の製剤学的製造法により製剤化して用いることが可能である。例えば、薬理学上許容される担体または媒体（生理食塩水、植物油、懸濁剤、界面活性剤、安定剤など）とともに患者に投与される。投与は、化合物の性質に応じて、経皮的、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、静脈内、または経口的に行われる。投与量は、患者の年齢、体重、症状、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択することが可能である。

#### 図面の簡単な説明

図1は、正常FLT3およびFLT3/ITDを導入したFDC-P1細胞の、FLT3タンパク質のチロシン残基のリン酸化を示す図である。細胞抽出物をFLT3抗体で免疫沈降(IP:FLT3)し、SDS-PAGEの後、抗リン酸化チロシン抗体でウェスタンブロットを行った（上段；IB:pTyr）。さらに、同じ膜を抗FLT3抗体でウェスタンブロットを行った（下段；IB:FLT3）。レーン1：Mt1、レーン2：Mt2、レーン3：Mt3、レーン4：Mt4。

図2は、正常FLT3および4種のFLT3/ITDを導入したFDC-P1細胞の増殖特性を示す図である。各細胞を、IL3およびFLの非存在下（左上；IL3(-)/FL(-)）、IL3(1ng/ml)存在下（右上；IL3(1ng/ml)/FL(-)）、FL(50ng/ml)存在下（左下；IL3(-)/FL(50ng/ml)）、またはIL3およびFL存在下（右下；IL3(1ng/ml)/FL(50ng/ml)）の条件で培養した。

図3は、FLT3/ITDを導入したFDC-P1細胞をマウスDBA2の皮下に接種して形成された腫瘍にFLT3/ITDのDNAおよび蛋白質が発現していることを示す図である。AはDNAをPCRで増幅後電気泳動し、腫瘍にFLT3/ITDのDNAが存在していることを示している。Bは抗FLT3抗体を用いた全細胞抽出物のウェスタンブロットであり、腫瘍にFLT3/ITDの蛋白質が存在していることを示している。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下に本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、本発明において、「FLT3」と表記したときは、特に断らない限り、正常FLT3だけでなく、FLT3/ITDを含む変異FLT3をも意味する。また、「FLT3異常」とは、変異FLT3の発現に加え、正常FLT3の高発現などのあらゆるFLT3の異常を意味する。

##### **[実施例1] 白血病細胞のFLT3/ITDの検出**

白血病細胞から、高分子DNAを単離し、FLT3タンパク質のJM領域を含むDNA断片を文献(H. Kiyoi, Leukemia 11: 1447-1452, 1997)記載の方法を用いてPCRにて増幅した。正常なサイズと異なるバンドをアガロースゲルから切り出し、Qiaex gel extraction kit(キアゲン社)で精製した後、メーカーの説明書に従ってpMOSBlue Tベクター(アマシャム社)へクローニングした。組換えコロニー10種類をLB培地で培養し、プラスミドDNAをQIAprep spin plasmid miniprep kit(キアゲン社)で調製し、塩基配列をシーケンスにより確認した。FLT3 mRNAの発現は文献(H. Kiyoi, Leukemia 11: 1447-1452, 1997)記載の方法に

従って、RT-PCRにて確認した。正常なサイズを示さないバンドを上記の方法でクローン化し、シーケンスにより配列を確認した。

その結果判明した、種々の造血器腫瘍におけるFLT3/ITDの出現頻度（FLT3/ITDの見られた症例数／検索症例数）を表1にまとめた。

表 1

診断	出現頻度	診断	出現頻度
ALL	0/48	AML(全体)	35/221
ATL	0/14	M0	0/2
CLL	0/15	M1	5/18
ET	0/3	M2	4/29
ML	0/16	M3	16/124
MM	0/38	M4	6/24
Histiocytosis	0/1	M5	4/20
CML-BC	0/13	M6	0/1
CMMoL	0/17	M7	0/3
MDS	1/15		

FLT3/ITDは造血器腫瘍の中でもAMLに特異的に見られることが確認され、その割合はAMLの約20%と効率であった。また、MDSにも見られたが、その割合は約3%と低かった。

#### 【実施例2】 FLT3/ITD発現プラスミドの血球系細胞への導入

白血病由来細胞よりtotal RNAを抽出し、cDNAを合成後、これを鋳型として、変異FLT3 cDNAのタンデムリピート領域を含むMunI-EcoRV断片をRT-PCRにて増幅した。プライマーにはMunI-Fプライマー(配列番号：11/5'-CAACAATTGGTG

TTTGTCTCCTCTT-3')およびEcoRV-Rプライマー(配列番号: 12/5'-CATGATATCTC GAGCCAATCCAAAG-3')を用いた。増幅した断片はMunIおよびEcoRV(ペーリンガーマンハイム山之内社)により切断し、アガロースゲルで分離後、前述の方法で精製した。正常FLT3 cDNAの全長(0. Rosnetら, 1993, Blood 82:1110-1119; Accession No.S64785)を有する発現ベクターpCDHF3(Olivier Rosnet博士より供与)をMunIおよびEcoRVで切断し、精製したFLT3/ITD遺伝子断片を挿入した。4種のFLT3/ITD (Mt1、Mt2、Mt3およびMt4)を用いた。Mt1~Mt4の変異領域の塩基配列をそれぞれ配列番号: 1、3、5および7に示し、そのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号: 2、4、6および8に示した。Mt1からMt4の発現ベクターを使用して、血球系細胞へのトランスフェクションを行った。

得られたFLT3/ITD発現プラスミドは、血球系細胞へ以下のように導入した。すなわち、Bio-Rad Gene Pulser Cuvettes (バイオラド社)を用い、pBabe-neoベクター(Nucleic Acids Res., 18:3587-3596, 1990)と10:1の割合でコトランスフェクト(300 Volts, 960  $\mu$ F)し、800ng/mlのネオマイシンで選択を行い、クローニング後、FACSおよびウェスタンブロットにてFLT3の発現を確認してトランスフェクトしたクローンを樹立した。

FLT3/ITD遺伝子を導入する細胞としては、幼若顆粒球系のFDC-P1細胞を用いた。

### [実施例3] トランスフェクタントのFLT3分子チロシンリン酸化

(1) 10%FCSを含むRPMI1640培地(GIBCO社)にてトランスフェクタントを培養し、 $2 \times 10^7$ 個の細胞を1000 rpm 5分にて回収し、PBSにて洗浄後、細胞ペレットをリシスバッファー(20mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 2mM EDTA, Nonidet P-40, 50mM NaF, 10mg/ml aprotinin, 10mg/ml leupeptin, 1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 50mM  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF))に溶解、4°C、1時間後、15000 rpm 30分間遠心し、上清にウサギ抗ヒトFLT3抗体(Santa Cruz Biotechnology社, Santa Cruz, CA, USA)を加え、4°C 2時間回転撹拌し、P

rotein A/G Plus agarose (Santa Cruz) を加え 4 °C 2 時間回転攪拌後、リシスバッファーにて 3 回洗浄し、サンプルローディングバッファー(0.125M Tris-HCl, pH6.8, 10% 2-メルカプトエタノール, 4% SDS)に溶解し、SDS-PAGEにて電気泳動後、Immobilon PVDF membrane (ミリポア社) に転写し、抗リン酸化チロシン抗体 (4G10, Upstate Biotechnology社, Lake Placid, NY, USA)にて反応後、ECLシステム (アマシャム社) にてバンドを検出した。同じ膜をストリッピングバッファー (100mM 2-メルカプトエタノール, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl, pH6.8)にて70°C30分インキュベートした後、ウサギ抗ヒトFLT3抗体 (Santa Cruz Biotechnology社, Santa Cruz, CA, USA) にて再度反応させ、FLT3蛋白の確認を行った。

FDC-P1細胞の結果を図 1 に示す。図 1 に示されるように、FDC-P1細胞に導入されたいずれのFLT3/ITDも、チロシン残基がリン酸化されており、FLT3/ITDは恒常的にFLT3/ITDのチロシン残基をリン酸化するシグナルが活性化されていることが判明した。また、正常FLT3タンパク質は、FL非存在下ではリン酸化されていないかった。

また、32D細胞において、FDC-P1細胞の場合と同様の結果が得られた。

#### [実施例 4] FLT3/ITD導入細胞の増殖特性

正常FLT3(wt) またはFLT3/ITD (Mt1からMt4) を導入した $5 \times 10^4$ 個のFDC-P1細胞を24ウェルプレート上に、次の4種の培地下で37°C、CO<sub>2</sub>インキュベータ中にて培養し、トリパンブルーで染色し、生細胞数を24時間毎4日間計数し、各細胞の増殖能を測定した。

培養条件は、

1. 10%FCSRPMI1640 のみ (図 2 左上)
2. 10%FCSRPMI1640 + 1ng/ml マウスIL3 (Genzyme社) (図 2 右上)
3. 10%FCSRPMI1640 + 50ng/ml ヒトFL (Purotech社) (図 2 左下)
4. 10%FCSRPMI1640 + 1ng/ml マウスIL3 + 50ng/ml ヒトFL (図 2 右下)

の4条件で行った。その結果を図2に示す。図に示されたように、正常FLT3導入細胞は、IL3非存在下では増殖できず、FLT3のリガンドであるFLを加えた場合でも、IL3依存性は変化しなかった。また、IL3およびFLの相乗効果も認められなかった。それに対して、FLT3/ITD導入細胞は、IL3を加えない場合でも、IL3存在下と同等の増殖を示し、その増殖速度は、正常FLT3導入細胞にIL3を加えた場合よりも有意に高かった。また、IL3および／またはFLによる増殖促進作用、相乗効果は認められなかった。

これらのデータから、FLT3/ITDは幼若顆粒球細胞において細胞内の増殖シグナル経路を活性化し、サイトカイン非依存的な増殖を引き起こすことが判明した。

また、32D細胞において、FDC-P1細胞の場合と同様の結果が得られた。

#### 産業上の利用の可能性

本発明により、FLT3/ITDの機能の抑制を指標とした、造血器腫瘍等に対する医薬品候補化合物のスクリーニング方法が提供された。本発明の方法により単離される化合物は、造血器腫瘍、特に急性骨髄性白血病における、FLT3/ITDの発現に起因する血球系細胞等の異常な増殖を抑制する効果が期待されるため、これら疾患に対する治療薬開発への利用が期待される。

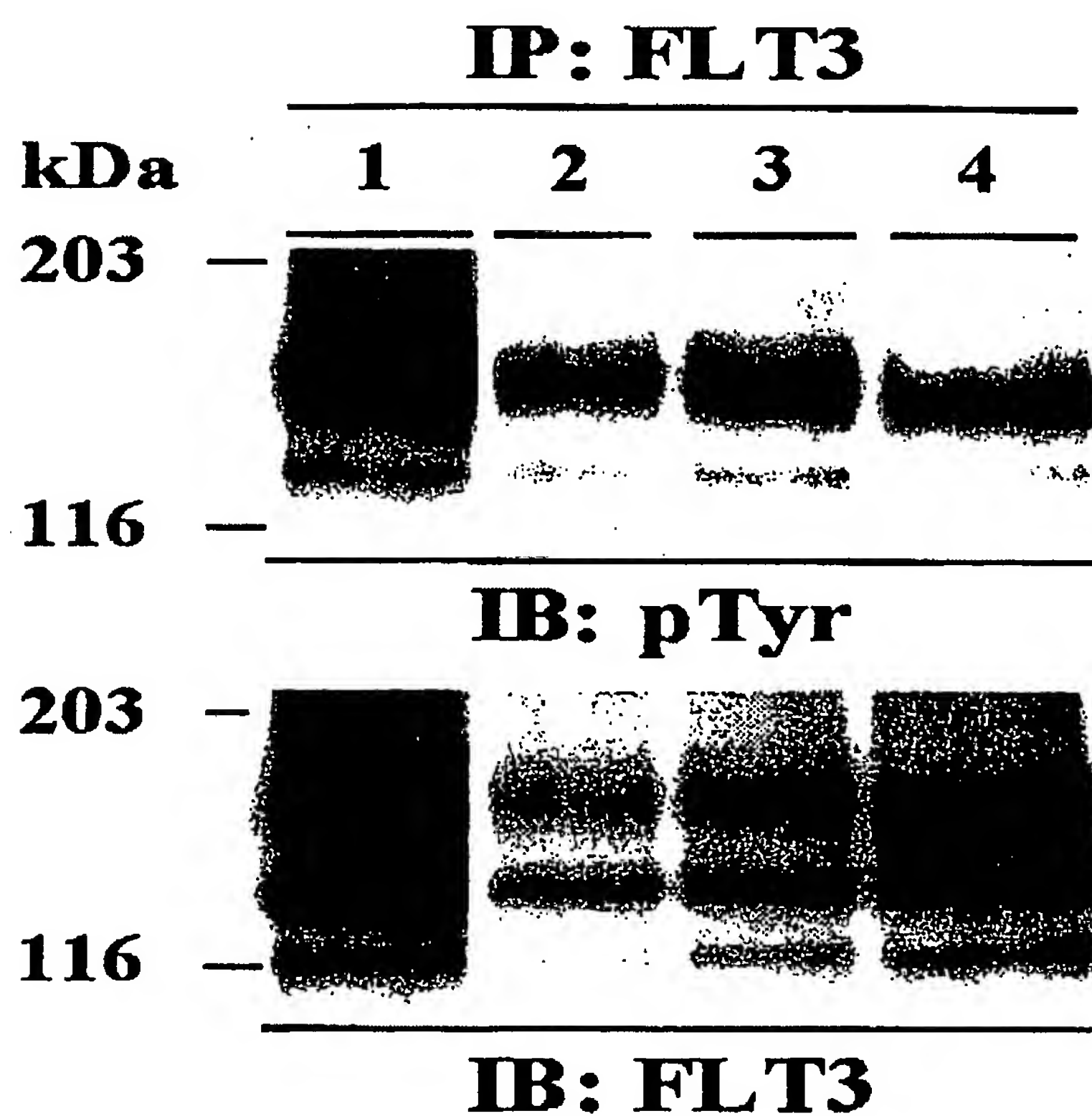
## 請求の範囲

1. 腫瘍に対する医薬品候補化合物をスクリーニングする方法であって、
  - (a) FLT3/ITDの発現によってサイトカイン非依存的増殖を示す動物細胞を提供する工程、
  - (b) 該細胞に対し被検試料を接触させ、サイトカイン非存在下において培養する工程、
  - (c) 該細胞の増殖を検出する工程、および
  - (d) 該細胞の増殖を抑制する化合物を選択する工程、を含む方法。
2. 腫瘍に対する医薬品候補化合物をスクリーニングする方法であって、
  - (a) FLT3/ITDの発現によってサイトカイン非依存的増殖を示す動物細胞を提供する工程、
  - (b) 該細胞に対し被検試料を接触させ、サイトカイン非存在下において培養する工程、
  - (c) 該細胞におけるFLT3/ITDのリン酸化を検出する工程、および
  - (d) 該細胞におけるFLT3/ITDのリン酸化を抑制する化合物を選択する工程、を含む方法。
3. 腫瘍に対する医薬品候補化合物をスクリーニングする方法であって、
  - (a) FLT3/ITDの発現によってサイトカイン非依存的増殖を示す動物細胞を提供する工程、
  - (b) 該細胞を非ヒト哺乳類動物に接種して腫瘍を形成させる工程、
  - (c) 該細胞を接種する前あるいは接種後に被検試料を該非ヒト哺乳類動物に投与し、腫瘍の形成を検出する工程、および
  - (d) 該非ヒト哺乳類動物の腫瘍の形成を抑制する化合物を選択する工程、を含む方法。

4. 腫瘍に対する医薬品候補化合物をスクリーニングする方法であって、
  - (a) FLT3/ITDの発現によって分化誘導能が抑制された動物細胞を提供する工程、
  - (b) 該細胞に対して被検試料を接触させて培養する工程、
  - (c) 該細胞の分化誘導能を検出する工程、および
  - (d) 該細胞の分化を促進する化合物を選択する工程、を含む方法。
5. 腫瘍が造血器腫瘍である、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。
6. 造血器腫瘍が急性骨髄性白血病または骨髄異形成症候群である、請求項 5 に記載の方法。
7. サイトカインがIL3である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。
8. 動物細胞が血球系細胞である、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。
9. 血球系細胞がFDC-P1細胞、32D細胞またはBaF3細胞である、請求項 8 に記載の方法。
10. 動物細胞が32D細胞である、請求項 4 に記載の方法。
11. 請求項 1 から 10 のいずれかに記載の方法により単離する、腫瘍に対する医薬品候補化合物。

1 / 3

図 1



BEST AVAILABLE COPY

図 2

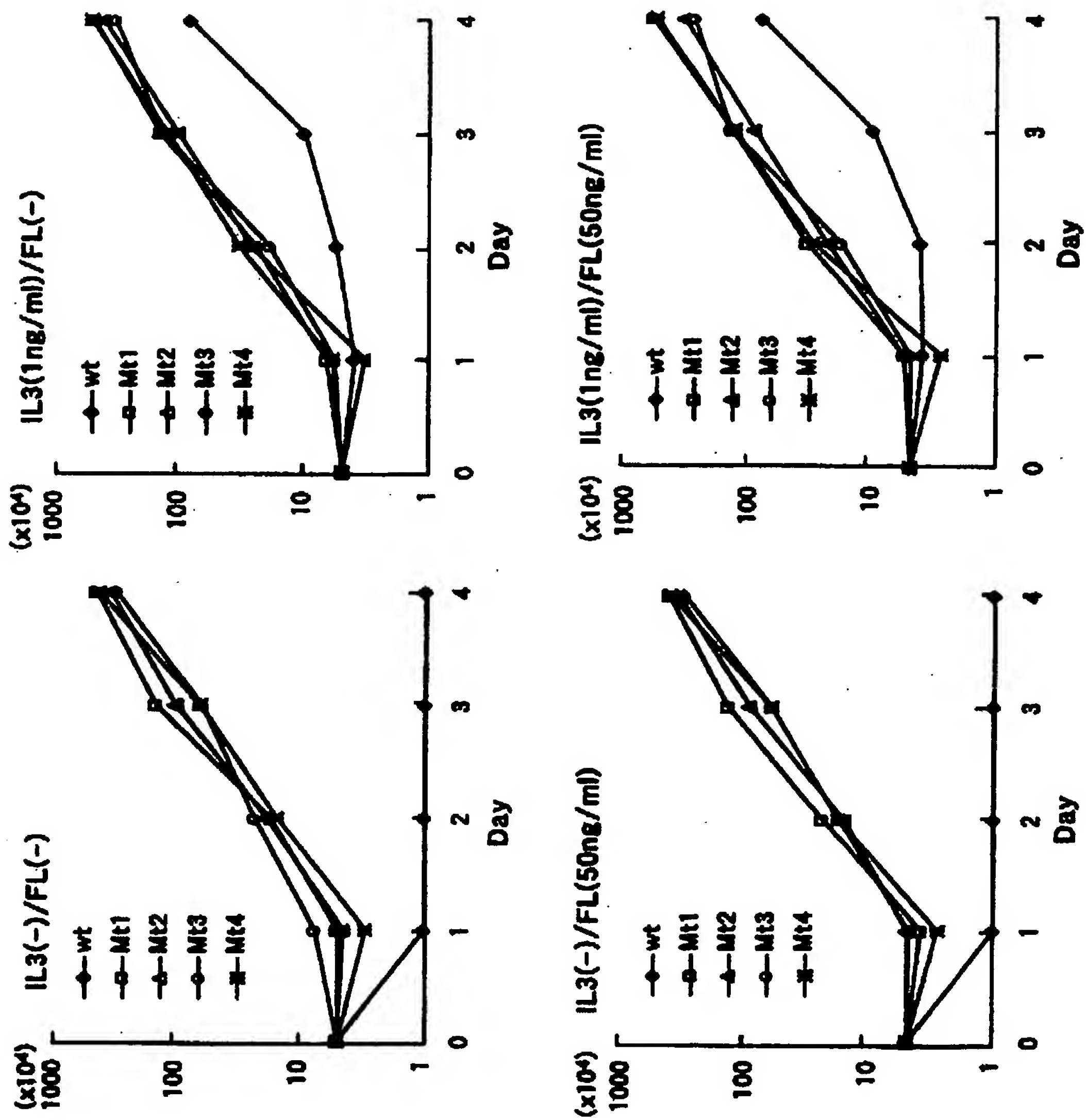
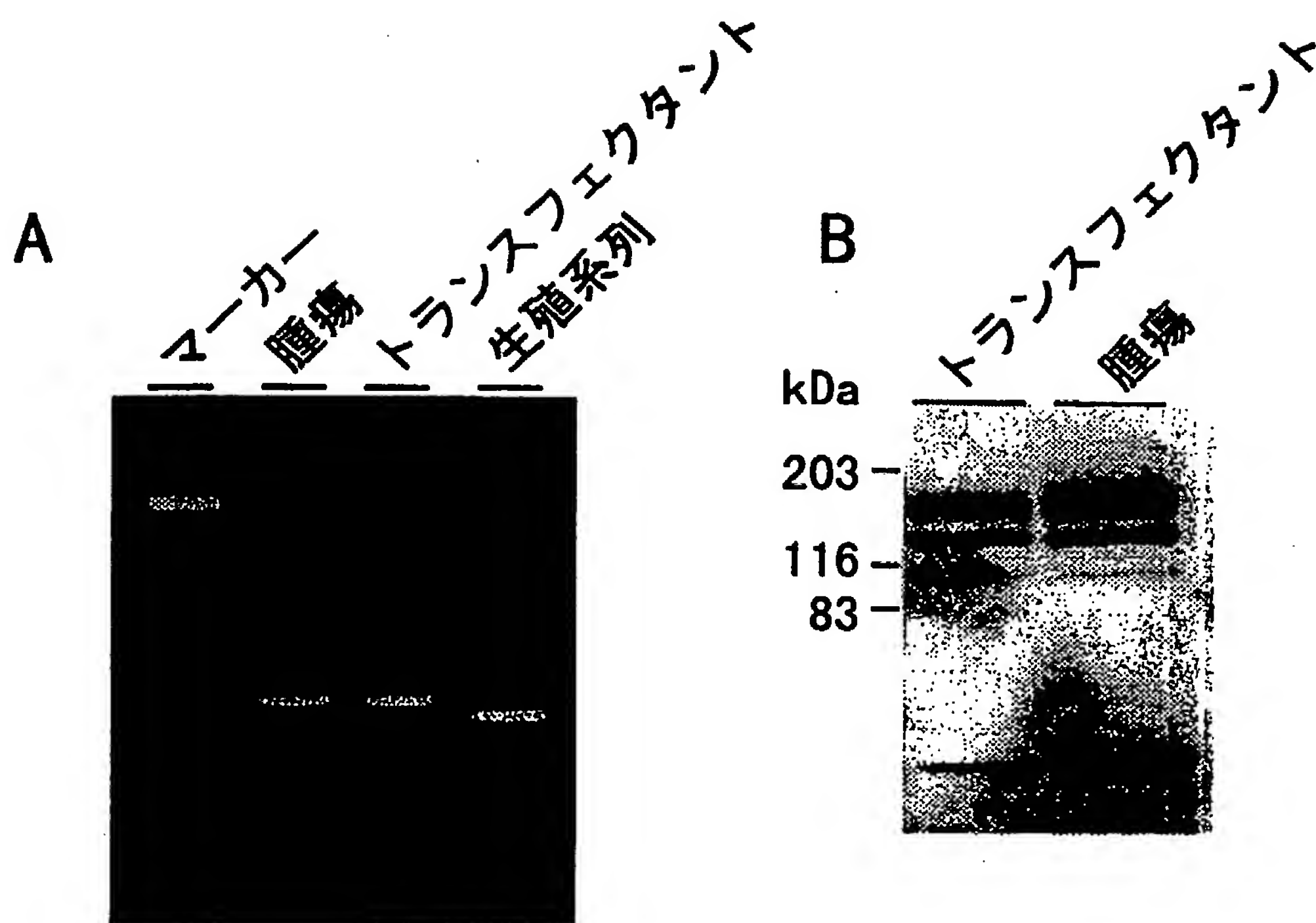


図 3



BEST AVAILABLE COPY

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

中外製薬株式会社

<120> Methods for screening of therapeutic agents for  
malignancies

腫瘍に対する医薬品候補化合物のスクリーニング方法

<130> C1-003PCT

<150> JP 1998-233729

<151> 1998-08-20

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 319

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(318)

&lt;223&gt; FLT3/ITD gene (Mt1) ; partial sequence

&lt;400&gt; 1

caa ttt agg tat gaa agc cag cta cag atg gta cag gtg acc ggc tcc 48

Gln Phe Arg Tyr Glu Ser Gln Leu Gln Met Val Gln Val Thr Gly Ser

1

5

10

15

tca gat aat gag tac ttc tac gtt gat ttc aga gaa tat gaa tat gat 96

Ser Asp Asn Glu Tyr Phe Tyr Val Asp Phe Arg Glu Tyr Glu Tyr Asp

20

25

30

ctc aaa tgg gag ttt cca aga gaa aat tgc tcc tca gat aat gag tac 144

Leu Lys Trp Glu Phe Pro Arg Glu Asn Cys Ser Ser Asp Asn Glu Tyr

35

40

45

ttc tac gtt gat ttc aga gaa tat gaa tat gat ctc aaa tgg gag ttt 192

Phe Tyr Val Asp Phe Arg Glu Tyr Glu Tyr Asp Leu Lys Trp Glu Phe

50

55

60

cca aga gaa aat tta gag ttt ggg aag gta cta gga tca ggt gct ttt 240

Pro Arg Glu Asn Leu Glu Phe Gly Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe

65

70

75

80

gga aaa gtg atg aac gca aca gct tat gga att agc aaa aca gga gtc 288

Gly Lys Val Met Asn Ala Thr Ala Tyr Gly Ile Ser Lys Thr Gly Val

85

90

95

tca atc cag gtt gcc gtc aaa atg ctg aaa g

319

Ser Ile Gln Val Ala Val Lys Met Leu Lys

100

105

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FLT3/ITD (Mt1) ; partial sequence. ITD region

(42)..(68)

&lt;400&gt; 2

Gln Phe Arg Tyr Glu Ser Gln Leu Gln Met Val Gln Val Thr Gly Ser

1

5

10

15

Ser Asp Asn Glu Tyr Phe Tyr Val Asp Phe Arg Glu Tyr Glu Tyr Asp

20

25

30

Leu Lys Trp Glu Phe Pro Arg Glu Asn Cys Ser Ser Asp Asn Glu Tyr

35

40

45

Phe Tyr Val Asp Phe Arg Glu Tyr Glu Tyr Asp Leu Lys Trp Glu Phe  
50 55 60

Pro Arg Glu Asn Leu Glu Phe Gly Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe  
65 70 75 80

Gly Lys Val Met Asn Ala Thr Ala Tyr Gly Ile Ser Lys Thr Gly Val  
85 90 95

Ser Ile Gln Val Ala Val Lys Met Leu Lys  
100 105

<210> 3

<211> 298

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(297)

<223> FLT3/ITD gene (Mt2) ; partial sequence.

<400> 3

caa ttt agg tat gaa agc cag cta cag atg gta cag gtg acc ggc tcc 48

Gln Phe Arg Tyr Glu Ser Gln Leu Gln Met Val Gln Val Thr Gly Ser

1 5 10 15

tca gat aat gag tac ttc tac gtt gat ttc aga gaa tat gaa tat gat 96

Ser Asp Asn Glu Tyr Phe Tyr Val Asp Phe Arg Glu Tyr Glu Tyr Asp

20 25 30

ctc aaa agc tcc tca gat aat gag tac ttc tac gtt gat ttc aga gaa 144

Leu Lys Ser Ser Ser Asp Asn Glu Tyr Phe Tyr Val Asp Phe Arg Glu

35 40 45

tat gaa tat gat ctc aaa tgg gag ttt cca aga gaa aat tta gag ttt 192

Tyr Glu Tyr Asp Leu Lys Trp Glu Phe Pro Arg Glu Asn Leu Glu Phe

50 55 60

ggg aag gta cta gga tca ggt gct ttt gga aaa gtg atg aac gca aca 240

Gly Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Lys Val Met Asn Ala Thr

65 70 75 80

gct tat gga att agc aaa aca gga gtc tca atc cag gtt gcc gtc aaa 288

Ala Tyr Gly Ile Ser Lys Thr Gly Val Ser Ile Gln Val Ala Val Lys

85 90 95

atg ctg aaa g 298

Met Leu Lys

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 99

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

<223> FLT3/ITD (Mt2) ; partial sequence. ITD region  
(35)..(54)

&lt;400&gt; 4

Gln Phe Arg Tyr Glu Ser Gln Leu Gln Met Val Gln Val Thr Gly Ser  
1 5 10 15

Ser Asp Asn Glu Tyr Phe Tyr Val Asp Phe Arg Glu Tyr Glu Tyr Asp  
20 25 30

Leu Lys Ser Ser Ser Asp Asn Glu Tyr Phe Tyr Val Asp Phe Arg Glu  
35 40 45

Tyr Glu Tyr Asp Leu Lys Trp Glu Phe Pro Arg Glu Asn Leu Glu Phe  
50 55 60

Gly Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Lys Val Met Asn Ala Thr  
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ile Ser Lys Thr Gly Val Ser Ile Gln Val Ala Val Lys

85

90

95

Met Leu Lys

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 271

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(270)

&lt;223&gt; FLT3/ITD gene (Mt3) ; partial sequence.

&lt;400&gt; 5

caa ttt agg tat gaa agc cag cta cag atg gta cag gtg acc ggc tcc 48

Gln Phe Arg Tyr Glu Ser Gln Leu Gln Met Val Gln Val Thr Gly Ser

1

5

10

15

tca gat aat gag tac ttc tac gtt gat ttc aga gaa tat gaa atg gga 96

Ser Asp Asn Glu Tyr Phe Tyr Val Asp Phe Arg Glu Tyr Glu Met Gly

20

25

30

atg ggg gga gaa tgt aat ccc ggg aga caa gat ctc aaa tgg gag ttt 144

Met Gly Gly Glu Cys Asn Pro Gly Arg Gln Asp Leu Lys Trp Glu Phe

35

40

45

cca aga gaa aat tta gag ttt ggg aag gta cta gga tca ggt gct ttt 192

Pro Arg Glu Asn Leu Glu Phe Gly Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe

50

55

60

gga aaa gtg atg aac gca aca gct tat gga att agc aaa aca gga gtc 240

Gly Lys Val Met Asn Ala Thr Ala Tyr Gly Ile Ser Lys Thr Gly Val

65

70

75

80

tca atc cag gtt gcc gtc aaa atg ctg aaa g 271

Ser Ile Gln Val Ala Val Lys Met Leu Lys

85

90

<210> 6

<211> 90

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> FLT3/ITD (Mt3) ; partial sequence. ITD region

(31)..(42)

&lt;400&gt; 6

Gln Phe Arg Tyr Glu Ser Gln Leu Gln Met Val Gln Val Thr Gly Ser

1 5 10 15

Ser Asp Asn Glu Tyr Phe Tyr Val Asp Phe Arg Glu Tyr Glu Met Gly

20 25 30

Met Gly Gly Glu Cys Asn Pro Gly Arg Gln Asp Leu Lys Trp Glu Phe

35 40 45

Pro Arg Glu Asn Leu Glu Phe Gly Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe

50 55 60

Gly Lys Val Met Asn Ala Thr Ala Tyr Gly Ile Ser Lys Thr Gly Val

65 70 75 80

Ser Ile Gln Val Ala Val Lys Met Leu Lys

85 90

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 271

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(270)

&lt;223&gt; FLT3/ITD gene (Mt4) ; partial sequence.

&lt;400&gt; 7

caa ttt agg tat gaa agc cag cta cag atg gta cag gtg acc ggc tcc 48  
Gln Phe Arg Tyr Glu Ser Gln Leu Gln Met Val Gln Val Thr Gly Ser  
1 5 10 15

tca gat aat gag tac ttc tac gtt gat ttc aga gaa tat gat gag tac 96  
Ser Asp Asn Glu Tyr Phe Tyr Val Asp Phe Arg Glu Tyr Asp Glu Tyr  
20 25 30

ttc tac gtt gat ttc aga gaa tat gaa tat gat ctc aaa tgg gag ttt 144  
Phe Tyr Val Asp Phe Arg Glu Tyr Glu Tyr Asp Leu Lys Trp Glu Phe  
35 40 45

cca aga gaa aat tta gag ttt ggg aag gta cta gga tca ggt gct ttt 192  
Pro Arg Glu Asn Leu Glu Phe Gly Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe  
50 55 60

gga aaa gtg atg aac gca aca gct tat gga att agc aaa aca gga gtc 240  
Gly Lys Val Met Asn Ala Thr Ala Tyr Gly Ile Ser Lys Thr Gly Val  
65 70 75 80

tca atc cag gtt gcc gtc aaa atg ctg aaa g 271

Ser Ile Gln Val Ala Val Lys Met Leu Lys

85

90

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 90

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FLT3/ITD (Mt4) ; partial sequence. ITD region

(30)..(40)

&lt;400&gt; 8

Gln Phe Arg Tyr Glu Ser Gln Leu Gln Met Val Gln Val Thr Gly Ser

1

5

10

15

Ser Asp Asn Glu Tyr Phe Tyr Val Asp Phe Arg Glu Tyr Asp Glu Tyr

20

25

30

Phe Tyr Val Asp Phe Arg Glu Tyr Glu Tyr Asp Leu Lys Trp Glu Phe

35

40

45

Pro Arg Glu Asn Leu Glu Phe Gly Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe

50

55

60

Gly Lys Val Met Asn Ala Thr Ala Tyr Gly Ile Ser Lys Thr Gly Val

65

70

75

80

Ser Ile Gln Val Ala Val Lys Met Leu Lys

85

90

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: A primer for  
amplifying human FLT3/ITD genes.

&lt;400&gt; 9

caacaattgg tgtttgtctc ctctt

25

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: A primer for  
amplifying human FLT3/ITD genes.

<400> 10

catgatatct cgagccaatc caaag

25

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04450

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl<sup>6</sup> G01N33/50, 33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>6</sup> G01N33/50, 33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1999  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1999 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-1999

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS [internal tandem duplication? \* FLT3]

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	S. Yokota, "INTERNAL TANDEM DUPLICATION OF THE FLT3 GENE IS PREFERENTIALLY SEEN IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA AND MYELODYSPLASTIC SYNDROME AMONG VARIOUS HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES. A STUDY ON A LARGE SERIES OF PATIENT AND CELL LINES" LEUKEMIA, VOL. 11, (1997), p.1605-1609	1-10
A	M. Nakao, "INTERNAL TANDEM DUPLICATION OF THE FLT3 GENE FOUND IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA", LEUKEMIA, VOL. 10, (1996), p.1911-1918	1-10
A	H. Kiyoi, "INTERNAL TANDEM DUPLICATION OF FLT3 ASSOCIATED WITH LEUKOCYTOSIS IN ACUTE PROMYELOCYTIC LEUKEMIA" LEUKEMIA, VOL. 11, (1997), p.1447-1452	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search  
29 September, 1999 (29. 09. 99)

Date of mailing of the international search report  
12 October, 1999 (12. 10. 99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04450

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 11  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
Although the invention as set forth in claim 11 relates to candidate compounds for a drug, it is unclear which compounds are involved therein.
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/04450

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> G 01 N 33/50, 33/15

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> G 01 N 33/50, 33/15

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-1999年
日本国登録実用新案公報	1994-1999年
日本国実用新案登録公報	1996-1999年

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS [ internal tandem duplication? \* FLT3 ]

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	S. Yokota, "INTERNAL TANDEM DUPLICATION OF THE FLT3 GENE IS PREFERENTIALLY SEEN IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA AND MYELODYSPLASTIC SYNDROME AMONG VARIOUS HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES. A STUDY ON A LARGE SERIES OF PATIENT AND CELL LINES" LEUKEMIA, VOL. 11, (1997), p. 1605-1609	1~10
A	M. Nakao, "INTERNAL TANDEM DUPLICATION OF THE FLT3 GENE FOUND IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA", LEUKEMIA, VOL. 10, (1996), p. 1911-1918	1~10
A	H. Kiyoi, "INTERNAL TANDEM DUPLICATION OF FLT3 ASSOCIATED WITH LEUKOCYTOSIS IN ACUTE PROMYELOCYTIC LEUKEMIA"	1~10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.09.99

国際調査報告の発送日

12.10.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

亀田宏之

2J

9015

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	LEUKEMIA, VOL. 11, (1997), p. 1447-1452	

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 11 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
請求の範囲11は、スクリーニング方法で選択された医薬品候補化合物の発明であるが、具体的にどのような化合物が含まれるのか不明である。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014851

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K48/00, 31/7088, 35/76, A61P35/00, 43/00, 35/02,  
C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K48/00, 31/7088, 35/76, A61P35/00, 43/00, 35/02,  
C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ROSNET O. et al., Human FLT3/FLK2 Gene:cDNA Cloning and Expression in Hematopoietic Cells., Blood, 15 August, 1993 (15.08.93), 82(4), pages 1110 to 1119	1-13,16
Y	WO 2000/11470 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 02 March, 2000 (02.03.00), Particularly, Claims; page 1, line 11 to page 3, line 10; page 9, line 25 to page 10, line 11 & EP 1109020 A1	1-13,16
Y	YEE Kevin W.H. et al., SU5416 and SU5614 inhibit kinase activity of wild-type and mutant FLT3 receptor tyrosine kinase., Blood, 15 October, 2002 (15.10.02), 100(8), p.2941-9	1-13,16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 January, 2005 (04.01.05)

Date of mailing of the international search report

25 January, 2005 (25.01.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014851

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YAMAMOTO Y. et al., Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies., Blood, 15 April, 2001 (15.04.01), 97(8), p.2434-9	1-13,16
Y	FIRE A. et al., Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans., Nature, 19 February, 1998 (19.02.98), Vol.391, pages 806 to 811	1-13,16
Y	DYKXHOORN D.M. et al., Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression., Nature Rev.Mol.Cell Biol., 2003 June, Vol.4, pages 457 to 467	1-13,16
Y	ELBASHIR S.M. et al., Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells., Nature, 24 May, 2001 (24.05.01), Vol.411, pages 494 to 498	1-13,16
Y	HEIDENREICH O. et al., AML1/MTG8 oncogene suppression by small interfering RNAs supports myeloid differentiation of t(8;21)-positive leukemic cells., Blood, 15 April, 2003 (15.04.03), 101(8), pages 3157 to 3163	1-13,16
Y	MARTINEZ L.A. et al., Synthetic small inhibiting RNAs: Efficient tools to inactivate oncogenic mutations and restore p53 pathways., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 12 November, 2002 (12.11.02), Vol.99, pages 14849 to 14854	1-13,16
Y	WILDA M. et al., Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi)., Oncogene, 2002, Vol.21, pages 5716 to 5724	1-13,16
Y	SCHERR M. et al., Specific inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA., Blood, 15 February, 2003 (15.02.03), 101(4), pages 1566 to 1569	1-13,16
Y	WOHLBOLD L. et al., Inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA sensitizes for imatinib mesylate(STI571)., Blood, 15 September, 2003 (15.09.03), 102(6), pages 2236 to 2239	1-13,16
Y	SHEN C. et al., Gene Silencing by adenovirus-delivered siRNA., FEBS Letters, 27 March, 2002 (27.03.02), Vol.539, pages 111 to 114	1-13,16